

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 772**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2009 PCT/EP2009/053002**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2009 WO09115465**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2009 E 09721382 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2252688**

54 Título: **Oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos y sus usos terapéuticos**

30 Prioridad:

19.03.2008 EP 08425175
07.05.2008 US 51088 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2017

73 Titular/es:

GENTIUM S.P.A. (100.0%)
Piazza XX Settembre 2
22079 Villa Guardia (Como), IT

72 Inventor/es:

STEIN, AARON CY y
IACOBELLI, MASSIMO

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 647 772 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos y sus usos terapéuticos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se relaciona con mezclas de oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos denominados Nmeros que varían entre 45meros y 55meros y pueden usarse para tratar o prevenir la enfermedad venooclusiva. Los oligonucleótidos de fosfodiésteres preferiblemente son heteropolímeros que comprenden A, G, C y T en cada una de sus posiciones, pero también pueden ser homopolímeros, es decir, puede haber bases idénticas en todas las posiciones de los oligonucleótidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 El término defibrotide designa una mezcla compleja de oligonucleótidos monocatenarios (15-80meros, promedio 45meros) obtenidos mediante la extracción de tejido animal y/o vegetal, particularmente del intestino de un cerdo o una vaca (US 3770720, US 3899481). El defibrotide, que tiene un peso molecular promedio de $16,5 \pm 2,5$ kDa, suele usarse en forma de sal con un metal alcalino, generalmente sodio. Principalmente es útil debido a su actividad antitrombótica (US 3829567), aunque puede usarse en otras aplicaciones, por ejemplo, para tratar la insuficiencia renal aguda (US 4694134) o la isquemia miocárdica aguda (US 4693995). Más adelante se citan otras publicaciones relacionadas con el defibrotide.

15 En US 5081109 se describe el uso del defibrotide en el tratamiento de arteriopatías periféricas en una fase avanzada (fases III y IV).

20 En US 5116617 se describen métodos para fortalecer los capilares en los seres humanos, que comprenden aplicar tópicamente composiciones que contienen defibrotide.

En US 5977083 se describe la posibilidad de tratar diversos estados de enfermedad modificando la dosis de defibrotide en respuesta a las fluctuaciones observadas en indicadores normales de la enfermedad o la reparación (por ejemplo, incremento, disminución, aparición, desaparición).

25 En US 6046172 se describen oligodesoxirribonucleótidos de origen animal que tienen un peso molecular de entre 4000 y 10000 daltons y que pueden obtenerse fraccionando polidesoxirribonucleótidos o despolimerizando química o enzimáticamente ácidos desoxirribonucleicos con un peso molecular alto.

En US 6699985 y US 5624912 se describe un método para usar el defibrotide en el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo infecciones del VIH.

En US 7338777 se describe un método para determinar la actividad biológica del defibrotide.

30 En EP1276497 se describe un método para incrementar la cantidad de células madre y células progenitoras en la sangre periférica de un mamífero, que comprende administrar defibrotide en combinación o proximidad temporal con al menos un factor hematopoyético útil para movilizar los progenitores hematopoyéticos (por ejemplo, G-CSF).

En WO2005023273 se describe la acción antitumoral del defibrotide.

En WO2006094916 se describe el uso del defibrotide en el tratamiento de tumores dependientes de la angiogénesis.

35 Además, en Defibrotide, a Polydisperse Mixture of Single Stranded Phosphodiester Oligonucleotides with Lifesaving Activity in Severe Hepatic Venocclusive Disease: Clinical Outcomes and Potential Mechanisms of Action, Kornblum et al. (Oligonucleotides, 16:105-114 (2006)), se describe el defibrotide y su uso en el tratamiento de la enfermedad venooclusiva (VOD).

40 En 1998, el Dr. Paul Richardson, del Instituto del Cáncer Dana-Farber, Boston, Massachusetts, comenzó a usar defibrotide para tratar la VOD hepática grave posterior a un trasplante de médula ósea. El fármaco se administró por vía intravenosa casi sin toxicidad y curó aproximadamente 40%-50% de los pacientes con una enfermedad que hasta el momento había sido mortal en 95% de los casos. La eficacia del defibrotide fue confirmada en estudios posteriores en múltiples instituciones en los Estados Unidos y Europa, aunque todavía se desconoce su mecanismo de acción.

En US 4985552 y US 5223609 se describe un proceso para producir defibrotide con el que puede obtenerse un producto con características fisicoquímicas constantes y bien definidas que carece de efectos secundarios indeseables.

En EP1325162 se describe un método para determinar la actividad biológica del defibrotide.

- 5 Durante décadas, el dogma ha sido que los oligonucleótidos de fosfodiésteres no pueden usarse como fármacos debido a la digestión por las nucleasas, pero en este contexto no se tiene en cuenta la posibilidad de administrar cantidades grandes en los pacientes debido a su toxicidad baja. En función de la experiencia clínica con el defibrotide, puede concluirse que las moléculas de este tipo pueden administrarse con eficacia terapéutica. Sin embargo, hay dudas sobre la posibilidad de reproducir el defibrotide de manera idéntica, ya que es un producto natural. Por ende, en la técnica existe la necesidad de desarrollar una composición que tenga el mismo efecto que el defibrotide pero que pueda reproducirse de manera idéntica.
- 10

RESUMEN DE LA INVENCION

- 15 La presente invención se relaciona con una formulación farmacéutica que es una solución acuosa y consiste en (a) agua, (b) una mezcla de oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos que tienen una longitud de entre 45 bases y 55 bases o entre aproximadamente 50 bases y aproximadamente 55 bases, y opcionalmente (c) excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables, y ningún otro ingrediente que afecte materialmente la actividad de los oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos, que puede usarse para tratar o prevenir la enfermedad venooclusiva. En la invención, los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios y sus secuencias pueden ser de ADN y/o ARN, y también pueden ser aleatorias.

- 20 En la invención, las bases de purinas de los oligonucleótidos pueden seleccionarse entre guanina, adenina, xantina e hipoxantina, y las bases de pirimidinas pueden seleccionarse entre citosina, timina, metilcitosina y uracilo, mientras que los azúcares pueden seleccionarse entre ribosa y desoxirribosa.

Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes al consultar la descripción detallada y los dibujos adjuntos.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES

Las siguientes definiciones se proveen para facilitar la comprensión de la presente invención.

- 30 Un nucleótido es un compuesto químico que consiste en 3 porciones: una base heterocíclica, un azúcar y uno o más grupos fosfato. En los nucleótidos más comunes, la base es un derivado de una purina o una pirimidina y el azúcar es una pentosa (un azúcar con cinco carbonos), desoxirribosa o ribosa. Los nucleótidos son monómeros de ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN o ARN.

- 35 Los oligonucleótidos son secuencias de nucleótidos cortas, típicamente con veinte o menos bases. Con sintetizadores automatizados, pueden sintetizarse oligonucleótidos de hasta 160-200 bases. Las extensiones de bases sintetizadas generalmente se denominan "meros" (el término griego que designa las partes). Por ejemplo, un fragmento de 25 bases es un 25mero.

Un enlace de fosfodiéster es un grupo de enlaces covalentes fuertes entre un átomo de fósforo en un grupo fosfato y otras dos moléculas en sendos enlaces éster. Los enlaces de fosfodiéster constituyen el esqueleto de las cadenas de ADN o ARN.

- 40 El ADN y el ARN son polímeros largos de unidades simples denominadas nucleótidos, con una cadena principal formada por azúcares y grupos fosfato unidos por enlaces de fosfodiéster. Cada azúcar está unido a uno de cuatro tipos de moléculas denominadas bases. En el ADN y el ARN, el enlace de fosfodiéster es un enlace entre un átomo de carbono 3' y un carbono 5' de una ribosa.

- 45 El ADN suele ser bicatenario y tiende a contener dos tipos de bases de purinas, guanina y adenina, y dos tipos de bases de pirimidinas, citosina y timina. En determinados casos, las bases de purinas y pirimidinas pueden reemplazarse por formas mutadas: la guanina y la adenina pueden reemplazarse por xantina e hipoxantina, respectivamente, y la citosina puede reemplazarse por metilcitosina. El ARN es muy similar al ADN, pero difiere en algunos detalles estructurales importantes: el ARN típicamente es monocatenario, mientras que el ADN típicamente es bicatenario. Además, los nucleótidos de ARN contienen ribosa como azúcar, mientras que el ADN contiene desoxirribosa, y el ARN contiene uracilo en lugar de la timina del ADN.

Una secuencia de nucleótidos aleatoria es una secuencia de nucleótidos que esencialmente contiene una mezcla pareja de dos bases de purinas diferentes y dos bases de pirimidinas diferentes, donde la probabilidad de que una base determinada se encuentre en una posición de la secuencia es de $25\% \pm 5\%$, preferiblemente $25\% \pm 2\%$, más preferiblemente $25\% \pm 1\%$.

5 Según se lo emplea en la presente, el término "aislado" se aplica a un material que ha sido removido del ambiente donde se encuentra naturalmente y ha sido caracterizado en un grado suficiente para confirmar su presencia en una muestra particular. Esta caracterización puede basarse en cualquier abordaje convencional, por ejemplo, secuenciación, hibridación, inmunoestudio, estudio funcional, expresión o determinación del tamaño. Por
10 consiguiente, un material biológico puede estar "aislado" si está libre de los componentes celulares, es decir, los componentes de las células donde se encuentra o se produce naturalmente.

Una organela, una célula o un tejido aislado es uno que ha sido removido del sitio anatómico (célula, tejido u organismo) donde se encuentra naturalmente. Un material aislado puede haber sido "purificado" o no. El término "purificado", según se lo emplea en la presente, se aplica a un material (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico o una proteína) que ha sido aislado bajo condiciones apropiadas para disminuir o suprimir detectablemente la presencia de otros materiales contaminantes. Los contaminantes pueden abarcar o no los materiales originales de los que se ha obtenido el material purificado. Un material purificado preferiblemente contiene menos de aproximadamente 90%, menos de aproximadamente 75%, menos de aproximadamente 50%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5% o menos de aproximadamente 2% en peso de otros componentes originales.

20 A menos que se indique específicamente lo contrario, en la práctica de la presente invención se emplearán métodos convencionales y conocidos en la técnica de biología molecular, biología celular y química de proteínas, algunos de los cuales se describen más adelante con fines ilustrativos. Estos métodos se describen exhaustivamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª edición, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (editado por D. Glover); *Oligonucleotide Synthesis* (editado por N. Gait, 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (editado por B. Hames y S. Higgins, 1985); *Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *Ausubel et al., Current protocols in Molecular Biology* (Nueva York, John Wiley and Sons, 1987); *Bonifacio et al., Current Protocols in Cell Biology* (Nueva York, John Wiley & Sons, 1999).

El término "aproximadamente" se aplica a un rango de error aceptable para cualquier valor particular determinado por aquellos versados en la técnica, que en parte depende del abordaje para medirlo o determinarlo, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede aplicarse a una desviación estándar aceptable, según es conocido en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" puede aplicarse a un rango de hasta $\pm 20\%$, preferiblemente hasta $\pm 10\%$, más preferiblemente hasta $\pm 5\%$, aun más preferiblemente hasta $\pm 1\%$ de un valor determinado. Como alternativa, particularmente con relación a los sistemas o los procesos biológicos, puede aplicarse a un orden de magnitud, que preferiblemente abarca el doble de un valor. A menos que se indique lo contrario, cuando en la solicitud y las reivindicaciones se citan valores particulares, el término "aproximadamente" está implícito y denota un rango de error aceptable para el caso.

40 Con relación a las enfermedades mencionadas en la presente, el término "tratamiento" y sus derivados hacen referencia a la prevención o el alivio de al menos un síntoma o a la demora o la reversión de su progreso. Por ejemplo, en el contexto de la presente invención, el término "tratamiento" también puede hacer referencia a la interrupción o la demora del inicio (es decir, el período previo a la manifestación de una enfermedad) o la disminución del riesgo de que se desarrolle o empeore una enfermedad. En la presente, el término "protección" puede hacer referencia a la prevención o el tratamiento del desarrollo o el empeoramiento de una enfermedad en un sujeto, o ambos, según sea apropiado.

45 La frase "farmacéuticamente aceptables", con relación a las composiciones de la invención, denota que se trata de entidades moleculares o ingredientes de otros tipos que son fisiológicamente tolerables y que típicamente no producen reacciones adversas cuando se los administra en un animal como un mamífero (por ejemplo, un ser humano). Preferiblemente, según se lo emplea en la presente, el término "farmacéuticamente aceptable" denota que un material ha sido aprobado para usarlo en mamíferos, particularmente en seres humanos, por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal, o que está citado en la Farmacopea de los EEUU o en otra farmacopea generalmente reconocida.

50 Según se la emplea en la presente, la expresión "mezcla de oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos" hace referencia a una mezcla de oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos que pueden tener secuencias idénticas o diferentes. Según una primera forma de realización, la mezcla puede comprender oligonucleótidos con secuencias idénticas y oligonucleótidos con secuencias diferentes, y los oligonucleótidos con secuencias diferentes pueden tener longitudes idénticas o diferentes. Según una segunda forma de realización, la mezcla puede consistir en oligonucleótidos con secuencias diferentes pero longitudes idénticas.

El término “administración” y sus derivados hacen referencia a todos los medios para aplicar directa o indirectamente un compuesto en el sitio de acción previsto.

El término “animal” hace referencia a cualquier animal, incluyendo los mamíferos, y particularmente los seres humanos.

5 DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Las figuras adjuntas, que se describen a continuación, se incluyen únicamente para ilustrar la forma de realización preferida de la presente invención, sin limitarla de modo alguno.

La figura 1A es un gráfico de la intensidad de bandas donde se ilustra la competencia del defibrotide y las fracciones con el peso molecular del defibrotide por la unión entre CIRNH³²P-OdT₁₈ y el bFGF.

10 La figura 1B es un gráfico de la intensidad de bandas normalizada en función del logaritmo de la concentración del defibrotide o las fracciones con el peso molecular del defibrotide.

En la figura 2 se provee un gráfico y una tabla donde se comparan los valores de K_C para el defibrotide, las fracciones con el peso molecular del defibrotide y los Nmeros en competencia por la unión entre CIRNH³²P-OdT₁₈ y el bFGF.

15 La figura 3A es un gráfico de la intensidad de bandas donde se ilustra la modificación del PDGF BB por el oligodesoxinucleótido alquilante CIRNH³²P-OdT.

La figura 3B es un gráfico de la intensidad de bandas en función de la concentración de oligodesoxinucleótidos reactivos.

La figura 3C es un gráfico recíproco doble de los resultados en la figura 3B.

20 En la figura 4 se provee un gráfico y una tabla donde se comparan los valores de K_C para el defibrotide, las fracciones con el peso molecular del defibrotide y los Nmeros en competencia por la unión entre CIRNH³²P-OdT₁₈ y el bFGF.

En la figura 5 se provee un gráfico y una tabla donde se comparan los valores de K_C para los Nmeros y los Tmeros en competencia por la unión entre CIRNH³²P-OdT₁₈ y el bFGF.

25 En la figura 6 se provee un gráfico y una tabla donde se comparan los valores de K_C para los Nmeros y los Tmeros en competencia por la unión entre CIRNH³²P-OdT₁₈ y la laminina.

La figura 7 es una tabla donde se comparan los valores de K_C para los Nmeros y los Tmeros en competencia por la unión entre CIRNH³²P-OdT₁₈ y la laminina.

30 La figura 8A es un gráfico donde se representa la inhibición de la proliferación de células HMEC-1 mediada por el bFGF por parte del defibrotide.

La figura 8B es un gráfico donde se representa el efecto de inhibición del defibrotide sobre el crecimiento celular en ausencia del bFGF.

La figura 9A es un gráfico donde se representa la inhibición de la proliferación de células HMEC-1 mediada por el bFGF por parte de Nmeros.

35 La figura 9B es un gráfico donde se representa el efecto de inhibición de Nmeros sobre el crecimiento celular en ausencia del bFGF.

La figura 10 es un gráfico donde se representa el efecto del defibrotide y los Nmeros sobre el tiempo parcial de la tromboplastina (PTT).

40 La figura 11A es un gráfico donde se representa la liberación dependiente de la dosis del TFPI en un medio condicionado por la exposición de células HMEC-1 a concentraciones crecientes de defibrotide durante 24 horas.

La figura B es un gráfico donde se representa la liberación del TFPI en función del tiempo en un medio condicionado inducido con defibrotide 5 μm.

La figura 11C es un gráfico donde se representa la liberación dependiente de la dosis del TFPI en un medio condicionado por la exposición de células HMEC-1 a concentraciones crecientes de defibrotide durante 30 minutos.

5 La figura 12A es un gráfico donde se representa la liberación dependiente de la dosis del TFPI en un medio condicionado por la exposición de células HMEC-1 a concentraciones crecientes de fracciones con el peso molecular del defibrotide.

La figura 12B es un gráfico donde se representa la liberación del TFPI en función del tiempo en un medio condicionado inducido con defibrotide 5 μ m.

La figura 13 es un gráfico que muestra la capacidad del defibrotide y los Nmeros de sustituir la heparina en la proliferación estimulada con bFGF y heparina de células C11 transfectadas con FGFR2.

10 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

15 Los oligonucleótidos como el defibrotide pueden unirse a las proteínas que se unen a la heparina. Según se lo emplea en la presente, el término heparina denota heparina con una afinidad baja. Pueden prepararse análogos sintéticos de defibrotide con una actividad comparable o superior a la del producto natural, y estos análogos tienen actividad anticancerígena debido a que pueden unirse a los factores de crecimiento que se unen a la heparina. Hay tres proteínas que se unen a la heparina que son de gran importancia para las células cancerosas: el factor de crecimiento de los fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la laminina, y la composición de la presente invención puede unirse a estas proteínas con una afinidad nanomolar, pero esta unión no tiene especificidad por la secuencia.

20 La presente composición se basa en el descubrimiento sorprendente de que las mezclas de oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos que tienen una longitud de entre aproximadamente 40meros y aproximadamente 65meros recapitulan las propiedades del defibrotide, por lo que pueden usarse como alternativas sintéticas a este principio activo. Los oligonucleótidos de la presente invención tienen una longitud de aproximadamente 45-55meros, preferiblemente aproximadamente 50-55meros.

25 Preferiblemente, las bases de purinas de los oligonucleótidos de la presente invención se seleccionan entre guanina, adenina, xantina e hipoxantina, y las bases de pirimidinas se seleccionan entre citosina, timina, metilcitosina y uracilo. Según una forma de realización, las secuencias de los oligonucleótidos están compuestas por mezclas de todas las bases (A, G, C y T), y preferiblemente son secuencias aleatorias. Según otra forma de realización, las secuencias de los oligonucleótidos consisten en bases idénticas (por ejemplo, timidina, es decir, Tx) en todas las posiciones (es decir, series Tm o Tmeros). Según otra forma de realización, el azúcar de los presentes oligonucleótidos se selecciona entre ribosa y desoxirribosa.

30 Según otra forma de realización, los oligonucleótidos de la presente invención consisten en secuencias de ADN o ARN.

Según una forma de realización preferida, los oligonucleótidos de la presente invención son monocatenarios.

35 Según será evidente a partir de la sección experimental, los presentes inventores sorprendentemente descubrieron que las fracciones de defibrotide que tienen un peso molecular bajo, y particularmente, aquellas que tienen un peso molecular inferior a 40 kDa, tienen la menor capacidad de unirse a los factores de crecimiento que se unen a la heparina. Merced a esto, pudieron seleccionarse mezclas de oligonucleótidos bien definidos que pueden reproducirse de manera sencilla e idéntica y pueden imitar los efectos del defibrotide.

40 Las mezclas de la presente invención pueden usarse para tratar pacientes mamíferos, preferiblemente seres humanos, que padecen enfermedades que pueden tratarse con defibrotide, por ejemplo, VOD, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), tumores o tumores dependientes de la angiogénesis (por ejemplo, mieloma múltiple o carcinoma de mama), y también pueden usarse como anticoagulantes o para incrementar la cantidad de células madre y células progenitoras en la sangre periférica de un mamífero al administrarlas en combinación o proximidad temporal con al menos un factor hematopoyético útil para movilizar progenitores hematopoyéticos.

45 Las mezclas de oligonucleótidos de la presente invención pueden administrarse de manera idéntica al defibrotide; preferiblemente se las administra por inyección, preferiblemente por vía intravenosa, mediante una solución acuosa. Esta solución acuosa puede comprender los oligonucleótidos en una concentración de entre 5 y 60 micromoles/litro, preferiblemente entre 10 y 50 micromoles/litro.

EJEMPLOS

50 La presente invención podrá comprenderse mejor a través de los siguientes ejemplos no limitativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

5 Generación de oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos. Para crear una serie de Nmeros, se usó una máquina de secuenciación de ADN (comúnmente disponible en el mercado, por ejemplo, ABI o Millipore). En la reacción de secuenciación, se emplearon cantidades idénticas (medidas como la molaridad) de cada base (adenina, citosina, guanina y timina). La máquina fue programada para obtener ADN monocatenario con longitudes aleatorias de entre 25 bases y 200 bases, y cada base fue seleccionada aleatoriamente entre las cuatro bases genéticas.

Cultivo de células

10 Se obtuvieron células HMEC-1 transformadas con SV40 de CDC, Atlanta, GA. Se las cultivó en un medio MCDB 131 con 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado con calor, 10 ng/ml del EGF, 1 µg/ml de hidrocortisona, 100 U/ml de penicilina G de sodio y 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin. Se obtuvieron células de la línea de melanoma humano sin micoplasma 518A2 del Dr. Volker Wacheck, Universidad de Viena, Austria. Las células se cultivaron en DMEM con 10% de FBS inactivado con calor, 100 U/ml de penicilina G de sodio y 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin. Las células de la línea de estrellado hepático LX2 fueron generadas mediante una inmortalización espontánea con el antígeno SV40 T en presencia de poco suero y fueron provistas por el Dr. Scott L. Friedman de la Escuela de Medicina Mount Sinai, Nueva York. Las células LX2 se cultivaron en DMEM con 1% de FBS inactivado con calor, 100 U/ml de penicilina G de sodio y 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin. Los cultivos madre se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂.

Generación de defibrotide, fracciones con el peso molecular del defibrotide y oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos

20 El defibrotide, un material polidisperso altamente complejo compuesto por polidesoxirribonucleótidos de fosfodiésteres de cadena simple (peso molecular: 16,5±2,25 kDa), preparado mediante la despolimerización controlada de ADN extraído de tejido intestinal porcino, fue provisto por Gentium (Como, Italia). Las fracciones con el peso molecular del defibrotide, que abarcan defibrotide aislado de tejido intestinal porcino y luego fraccionado (A2, E2, G2, 12 y L2, con pesos moleculares de 9353, 12258, 16761, 21840 y 26190 daltons, respectivamente), también fueron provistas por Gentium. Los Nmeros (una serie de oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos con diversas longitudes definidas) y los Tmeros (una serie de homopolímeros de fosfodiésteres de timina con una longitud definida) fueron sintetizados y purificados según el procedimiento detallado con anterioridad y fueron provistos por Trilink Biotechnologies (San Diego, CA).

Proteínas recombinantes y materiales de cultivo celular

30 El bFGF y el VEGF165 humanos recombinantes, el factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF BB) y el factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico que puede unirse a la heparina (HB-EGF) se adquirieron en R&D Systems (Minneapolis, MN). La laminina se obtuvo en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El DMEM, el MCDB 131, el medio M199 y el FBS se obtuvieron en Invitrogen (Carlsbad, CA). Se adquirieron placas recubiertas con fibronectina y Matrigel en BD Bioscience (Bedford, MA). El conjunto de elementos IMUBIND Total TFPI ELISA se obtuvo en American Diagnostica (Stanford, CT).

Síntesis de sondas de oligodesoxinucleótidos alquilantes CIRNH³²P-OdT₁₈

40 Se marcaron diez OD U de OdT₁₈ en el extremo 5' con [³²P]fosfato mediante una reacción con 5'-polinucleótido quinasa. El exceso de ATP se separó del producto de la reacción mediante una cromatografía con Sephadex G25 en perclorato de litio 0,1 M. El oligonucleótido se hizo precipitar agregando 2% de LiClO₄/acetona y se disolvió en agua en una concentración de 200 OD U/µl. Posteriormente, el oligonucleótido se hizo precipitar agregando una solución acuosa de bromuro de cetiltrimetilamonio al 8% y se secó. Al oligonucleótido seco se le agregaron 6,5 mg de p-(bencilamino)-N-cloroetil-N-metilamina (CIRNH₂) en 20 µl de dimetilformamida, seguidos por 8 mg de disulfuro de dipiridilo y 9,5 mg de trifenilfosfina. Después de 2 horas, el oligonucleótido se hizo precipitar agregando 2% de LiClO₄/acetona, se disolvió en 25 µl de NaCl 1 M, se hizo precipitar con etanol y se secó. El producto final se disolvió nuevamente en agua y se almacenó a -80°C.

Modificación de las proteínas que pueden unirse a la heparina con CIRNH³²P-OdT₁₈

50 La modificación de las proteínas que pueden unirse a la heparina con CIRNH³²P-OdT₁₈ se realizó según el método de Yakubov et al. (Oligonucleotides interact with recombinant CD4 at multiple sites, J. Biol. Chem., 1993, 268:19918-18823). Inicialmente, se incubó bFGF (concentración: 50 nM), PDGF BB (500 nM), VEGF (150 nM), laminina (50 nM) o HB-EGF (400 nM) en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, con CIRNH³²P-OdT₁₈ 10-20 µM. El defibrotide, las fracciones con el peso molecular del defibrotide, los Tmeros o los Nmeros se usaron en concentraciones crecientes como competidores por la unión entre las sondas de oligonucleótidos de fosfodiésteres y las proteínas. Después de 1 hora a 37°C, se agregó un volumen de un amortiguador que contenía 10% de glicerol, 4% de 2-mercaptoetanol, 4% de

SDS y 0,2% de azul de bromofenol y se realizó una SDS-PAGE. Se secaron los geles y se los expuso a una película de rayos X Kodak hasta que se visualizaron las bandas. Se reveló la película y se cuantificaron las densidades de las bandas mediante una densitometría láser.

Estudio de la proliferación

5 Se trataron células HMEC-1 confluentes en su lugar durante 24 horas con un medio M199 que contenía 2,5% de FIBS y se las sembró (2×10^4 células/cavidad) en placas con 96 cavidades recubiertas con fibronectina (en un medio M199 con 2,5% de FIBS). Se reemplazó el medio por un medio nuevo con 20 ng/ml del bFGF solo o defibrotide o Nmeros, con bFGF o sin él. Después de 3 días de tratamiento a 37°C, se evaluó el crecimiento de las células con una coloración con sulforrodamina B. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado.

10 Determinación de la liberación del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI)

Se sembraron células HMEC-1 en placas con 24 cavidades con un medio M199 que contenía 2,5% de FIBS en una densidad de 10×10^4 células/cavidad. Las células se trataron con defibrotide, fracciones con el peso molecular del defibrotide o Nmeros durante diversos períodos de tiempo. Se recolectó el medio celular acondicionado, se lo centrifugó a 10000 G durante 10 minutos para eliminar los residuos celulares y se evaluó la concentración del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) en el medio con un ELISA, según las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS

Las fracciones con el peso molecular del defibrotide y los Nmeros interactúan de manera similar con las proteínas que se unen a la heparina

20 El defibrotide, las fracciones con el peso molecular del defibrotide y los Nmeros interactúan con las proteínas que se unen a la heparina, que son importantes para el crecimiento, la viabilidad, la angiogénesis y la migración de los tumores. La evaluación de la capacidad del defibrotide, las fracciones con el peso molecular del defibrotide y los Nmeros de unirse a proteínas que pueden unirse a la heparina se realizó con un estudio de la competición. En el primer paso, se sintetizó un homopolímero 18mero de timidina alquilante de fosfodiéster marcado con ^{32}P (CIRNH ^{32}P -OdT $_{18}$). Esta molécula se mezcló con bFGF, PDGF BB, BB, VEGF, laminina o HB-EGF, se incubó en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4, con la sonda marcada 10-20 μM y concentraciones crecientes de defibrotide, fracciones con el peso molecular del defibrotide o Nmeros. La mezcla se separó mediante una electroforesis en un gel y se autorradiografió. El defibrotide, las fracciones con el peso molecular del defibrotide y los Nmeros compitieron por la unión con CIRNH ^{32}P -OdT $_{18}$, y por lo tanto, por la alquilación de las proteínas por el oligonucleótido marcado con radiactividad. El valor de K_d para CIRNH ^{32}P -OdT $_{18}$ para cada una de estas proteínas ya ha sido determinado: el promedio de K_d para el bFGF es de 0,5 μM (Guvakova, et al., Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix, J. Biol. Chem., 1995 (270), 2620-2627), y el promedio de K_d para la laminina es de 14 μM (Khaled, et al., Multiple mechanisms may contribute to the cellular antiadhesive effects of phosphorothioate oligodeoxynucleotides, Nucl. Acids Res., 1996 (24), 737-745). Para determinar K_d para VEGF165, se examinó la dependencia de la concentración de la modificación del VEGF por CIRNH ^{32}P -OdT $_{18}$ (figura 3A). Estos resultados se representan en la figura 3B, donde la concentración del oligodesoxinucleótido modificador se representa en función de la intensidad de la banda en el gel. La asociación del VEGF al oligodesoxinucleótido modificador presenta una saturación aproximada y puede describirse con una ecuación de unión en un solo sitio del tipo de Michaelis-Menton. La figura 3C es un gráfico recíproco doble de los resultados en la figura 3B. Los resultados son lineales (R^2 : 0,98), y la línea se cruza con una abscisa que corresponde a un valor de K_d aparente de 33,9 μM . Se realizaron experimentos similares con PDGF BB y HB-EGF. El valor de K_d fue 4,5 y 8,7 μM , respectivamente.

La K_c se calculó a partir con la ecuación de Cheng y Prusoff:

$$\text{Ecuación 1: } K_c = IC_{50} / (1 + [\text{CIRNH}^{32}\text{P-OdT}_{18}] / K_d)$$

45 En la figura 1A se representa la competencia por la unión al bFGF. De manera acorde con la ecuación 1, el gráfico de la intensidad normalizada de las bandas en el gel en función de la concentración del competidor fue lineal (figura 1B). La IC_{50} se determinó por inspección. También se observó una competencia similar en la unión entre diversos competidores y todas las proteínas de interés. Los valores de K_c , determinados de manera idéntica, se resumen en las tablas de las figuras 2, 4, 5, 6 y 7.

50 Los Nmeros y el defibrotide inhiben de una manera dependiente de la longitud la capacidad de los factores de crecimiento que se unen a la heparina de estimular al máximo el crecimiento de células HMEC-1 transformadas con SV40 en un cultivo de tejidos

El crecimiento celular estimulado por citoquinas se determinó usando sulforrodamina B (SRB). Estos experimentos se realizaron en células HMEC-1 transformadas con SV40, cuyo crecimiento es estimulado por el bFGF. Las células se colocaron en suero al 0% durante 24 horas, se trataron con bFGF en un medio M199 con 2,5% de FBS para regular positivamente los receptores del bFGF en la superficie y se incubaron durante 3 días en un medio que contenía 20 ng/ml del bFGF, con concentraciones crecientes de defibrotide o Nmeros o sin ellos. Según se ilustra en las figuras 8 y 9, tanto los Nmeros, de una manera dependiente de la longitud (se obtuvo un efecto con una longitud de aproximadamente 45 nucleótidos o más), como el defibrotide provocaron una disminución pequeña (y en el caso de los Nmeros, dependiente de la longitud) en la proliferación celular máxima inducida por el bFGF. La tasa de proliferación de las células HMEC-1 se incrementó 60%-70% después del tratamiento con el bFGF, en comparación con el grupo no estimulado o el control con bFGF. El efecto de inhibición del defibrotide aplicado 1 hora antes del bFGF no fue significativamente diferente del observado al aplicarlo simultáneamente (resultados no provistos).

Evaluación de la toxicidad del defibrotide y los Nmeros

La mayor parte de la toxicidad del defibrotide y los Nmeros, asociada a coagulopatía y hemorragias, es el resultado de la unión entre los oligonucleótidos y los componentes que pueden unirse a la heparina en la cascada de coagulación, con lo que se inhibe la función de estos últimos. Este efecto anticoagulante se evaluó en función del tiempo parcial de la tromboplastina (PTT). Se mezcló plasma de voluntarios saludables con diversas concentraciones de defibrotide o Nmeros y se realizó un estudio convencional del PTT. Según se ilustra en la figura 10, el defibrotide y los Nmeros no incrementaron significativamente el PTT. Solamente una concentración alta de defibrotide, N50 o N60 (aproximadamente 100 μ M) indujeron un incremento en el PTT (1,5-1,7 veces el control) (figura 10). Los Nmeros más largos, N80, no tuvieron efecto alguno, incluso en una concentración de 25 μ M.

El defibrotide, las fracciones con el peso molecular del defibrotide y los Nmeros incrementan la síntesis del inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) y su liberación desde células HMEC-1

Para investigar cómo el defibrotide afecta la liberación aguda y a largo plazo del TFPI, una proteína que disminuye la coagulopatía, desde células HMEC-1, se realizaron estudios de la concentración y el progreso en el tiempo. Se recolectó medio condicionado con células HMEC-1 a intervalos de tiempo seleccionados y se determinó el nivel del TFPI con un ELISA, según las instrucciones del fabricante. Según se ilustra en la figura 11A, el defibrotide 12,5 μ M indujo un incremento dependiente del tiempo en el nivel del TFPI en el medio, con una cantidad sustancial liberada después de 20-30 minutos (un incremento de 5-6 veces con relación a las células control). Durante la fase aguda (30 minutos), la estimulación de las células HMEC-1 con concentraciones crecientes de defibrotide indujo un incremento dependiente de la concentración en la liberación del TFPI, que se estabilizó con el defibrotide en una concentración de 12,5 μ M (figura 11C). Después de incubar las células durante 24 horas con fracciones con el peso molecular del defibrotide o Nmeros 12,5 μ M, se observó un incremento de 7-8 veces en el nivel del TFPI en el medio, en comparación con las células no estimuladas.

Determinación de la mitogénesis en células C11

Los clones C11 son células linfoides de ratón BAF3 que han sido modificadas para sobreexpresar el receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos 1 (FGFR-1), al cual el bFGF se une con una afinidad alta (pM). Estas células fueron provistas por D. Ornitz (Universidad de Washington, St. Louis). El bFGF es imprescindible para la proliferación de estas células, y también se sabe que la heparina es necesaria para la actividad del bFGF. Con anterioridad, se había demostrado que el DF y los Nmeros podían remover el bFGF de los sitios de unión con una afinidad baja (nM) en la matriz extracelular (Guvakova, et al., Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix, J. Biol. Chem., 1995 (270), 2620-2627). Los inventores intentaron determinar si el DF y los Nmeros podían interferir con la unión del bFGF a los sitios de unión con una afinidad alta. En este contexto, se lavaron células C11 dos veces con un medio RPMI sin IL-3. Se sembraron $2,2 \times 10^4$ células por cavidad en placas con 48 cavidades. Se agregó el bFGF (1 nM final) y DF o Nmeros (10 μ M final) o heparina (1 μ g/ml) en un volumen total de 200 μ l. Las células (n=3 para cada experimento) se incubaron durante 2-3 días y se colorearon con azul de sulforrodamina (SRB). Se normalizó la cantidad de células con el control (proliferación en ausencia de bFGF, heparina u oligonucleótidos). Según se ilustra en la figura 13, el bFGF o la heparina por sí solos tuvieron un efecto escaso o nulo sobre la proliferación celular después de 3 días. La actividad del bFGF fue potenciada por la heparina y el DF, una indicación de que podría usarse DF en lugar de heparina. Sin embargo, el DF no afectó la unión del bFGF a los sitios de unión con una afinidad alta. También podrían usarse Nmeros en lugar de DF o heparina, de una manera dependiente de su longitud, pero su actividad no fue tan grande como la del DF hasta una longitud de aproximadamente 80meros.

CONCLUSIONES

Los oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos (Nmeros) de la presente invención virtualmente pueden recapitular las propiedades del defibrotide.

- 5 Se comparó la capacidad de los Nmeros y el defibrotide de unirse a proteínas que pueden unirse a la heparina (incluyendo bFGF, PDGF BB, VEGF165, laminina y HB-EGF) e inducir la liberación del TFPI desde células HMEC-1. Los Nmeros puede administrarse mediante una infusión intravenosa en solución salina normal o dextrosa al 5% en agua en un paciente que padece cáncer o VOD (u otras enfermedades que pueden tratarse con defibrotide) en una dosis de entre 10 y 60 mg/kg de peso corporal por día, administrada en una sola ocasión o en varias aplicaciones diarias, durante aproximadamente 14 días. La dosis puede ser ajustada en función de la respuesta del paciente a la terapia particular.
- 10 En función de los valores de K_c para el bFGF y el PDGF y los Nmeros con diversas longitudes (figuras 2, 4, 5, 6, 7), se demostró que los Nmeros con una longitud de aproximadamente 40meros fueron apropiados para obtener una actividad máxima. En función de los valores de K_c , también se demostró que los Nmeros más largos no tuvieron una contribución importante en la afinidad general de las proteínas que pueden unirse a la heparina. Como consecuencia, en función de la mayor proporción peso/dosis y la dificultad de sintetizarlos, los Nmeros con longitudes superiores a aproximadamente 65meros parecerían ser inútiles como alternativas al defibrotide.
- 15 Por ende, los oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos que tienen una longitud de entre aproximadamente 40meros y aproximadamente 65meros pueden usarse como alternativas al defibrotide, y en particular, pueden usarse en todas las aplicaciones terapéuticas descritas con anterioridad en la sección de los antecedentes de la invención, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.
- 20 Una de las ventajas de la presente invención es que la dosis de las formulaciones farmacéuticas correspondientes puede establecerse en función de la concentración de los oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos en lugar de su actividad biológica, en contraste con las mezclas actuales de oligonucleótidos de origen extractivo.
- Una ventaja adicional se debe al hecho de que en la presente invención solamente se administran secuencias activas. Por consiguiente, si se realiza una comparación, por ejemplo, con mezclas de oligonucleótidos de origen extractivo, se aplican menos oligonucleótidos por dosis, con ventajas evidentes en términos de la eficacia, la seguridad y los efectos secundarios.
- 25 Si bien la presente invención ha sido descrita con un cierto detalle, ha de ser evidente la posibilidad de realizar numerosos cambios y modificaciones en las formas de realización precedentes sin apartarse del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación farmacéutica que es una solución acuosa y consiste en (a) agua, (b) una mezcla de oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos que tienen una longitud de entre 45 bases y 55 bases, donde los oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos tienen secuencias diferentes y longitudes idénticas o diferentes, y opcionalmente (c) excipientes y/o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables, que puede usarse para tratar o prevenir la enfermedad venooclusiva.
2. La formulación farmacéutica que puede usarse según la reivindicación 1, donde los oligonucleótidos de fosfodiésteres sintéticos tienen secuencias diferentes y longitudes idénticas.
- 10 3. La formulación farmacéutica que puede usarse según la reivindicación 1, donde los oligonucleótidos tienen una longitud de entre aproximadamente 50 bases y aproximadamente 55 bases.
4. La formulación farmacéutica que puede usarse según la reivindicación 1, donde los oligonucleótidos son monocatenarios.
5. La formulación farmacéutica que puede usarse según la reivindicación 1, donde las secuencias de los oligonucleótidos son secuencias de ADN y/o ARN.
- 15 6. La formulación farmacéutica que puede usarse según la reivindicación 1, donde las secuencias de los oligonucleótidos son secuencias aleatorias.
7. La formulación farmacéutica que puede usarse según la reivindicación 1, donde las bases de purinas de los oligonucleótidos se seleccionan entre guanina, adenina, xantina e hipoxantina y las bases de pirimidinas se seleccionan entre citosina, timina, metilcitosina y uracilo.
- 20 8. La formulación farmacéutica que puede usarse según la reivindicación 1, donde el azúcar de los oligonucleótidos se selecciona de entre ribosa y desoxirribosa.
9. La formulación farmacéutica que puede usarse según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se administra por vía intravenosa.
- 25 10. La formulación farmacéutica que puede usarse según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se le administra a un mamífero.
11. La formulación farmacéutica que puede usarse según la reivindicación 10, donde el mamífero es un ser humano.
12. La formulación farmacéutica que puede usarse según la reivindicación 1, que comprende una concentración de oligonucleótidos de entre 5 y 60 micromoles/litro.
- 30 13. La formulación farmacéutica que puede usarse según la reivindicación 12, que comprende una concentración de oligonucleótidos de entre 10 y 50 micromoles/litro.

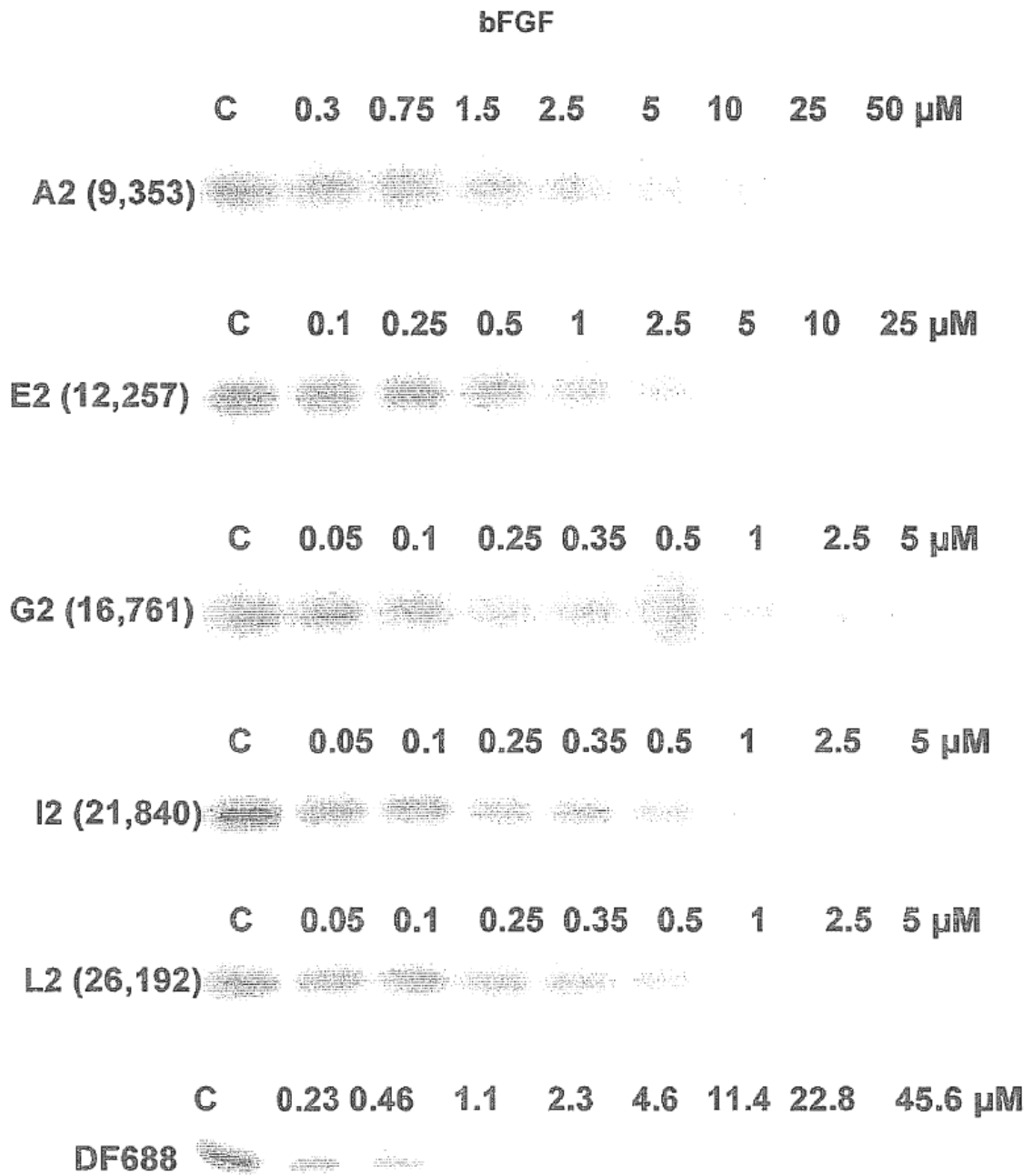


Fig. 1A

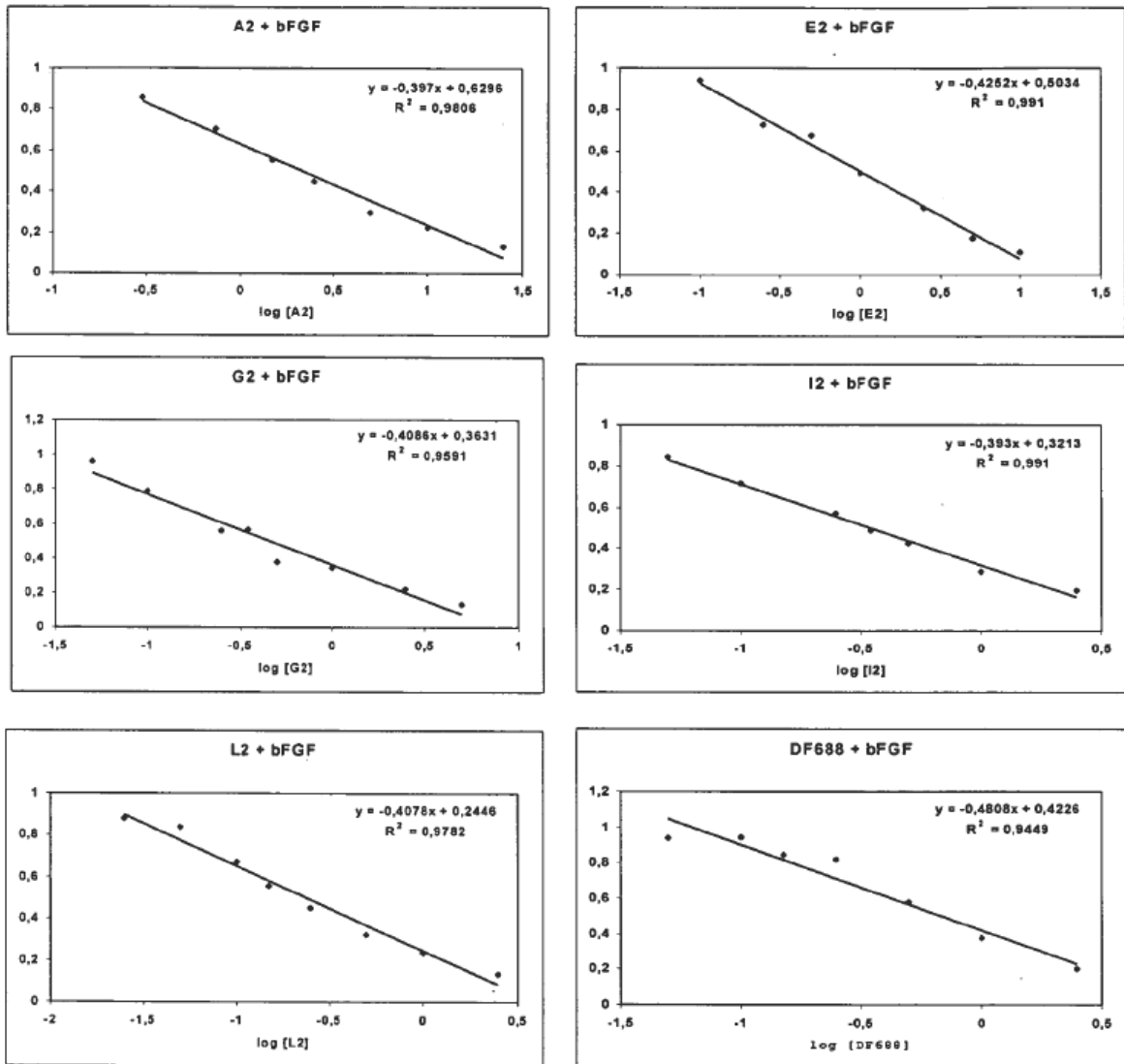
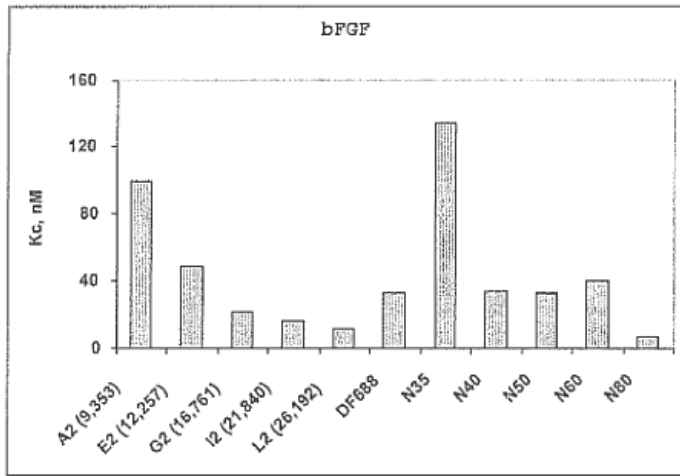
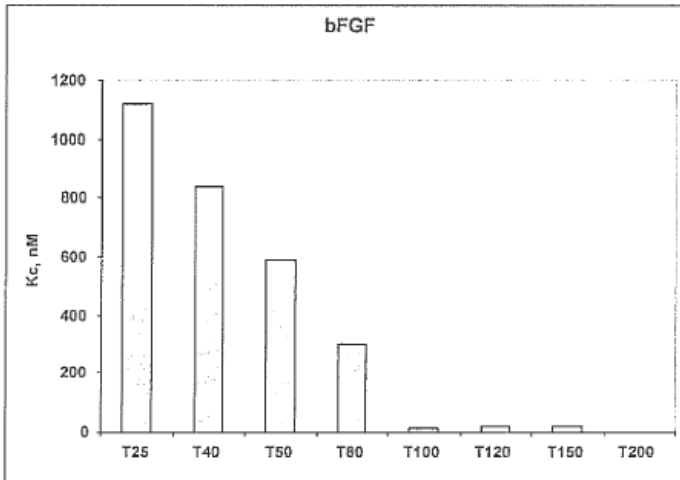


Fig. 1B



DF	Kc, nM
A2 (9,353)	100
E2 (12,257)	48.6
G2 (16,761)	22
I2 (21,840)	16.7
L2 (26,192)	11.2
DF688	32.4
N35	134
N40	33.5
N50	33
N60	40
N80	7.1



Oligo	Kc, nM
T25	1120
T40	840
T50	590
T80	300
T100	10
T120	16
T150	21
T200	2

Fig. 2

A) 0.1 0.25 0.5 1 2.5 5 10 25 50 100 μM

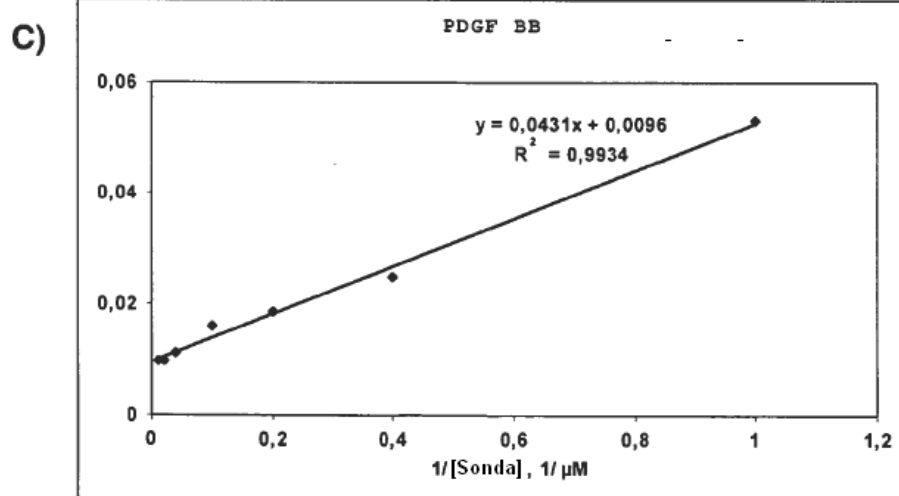
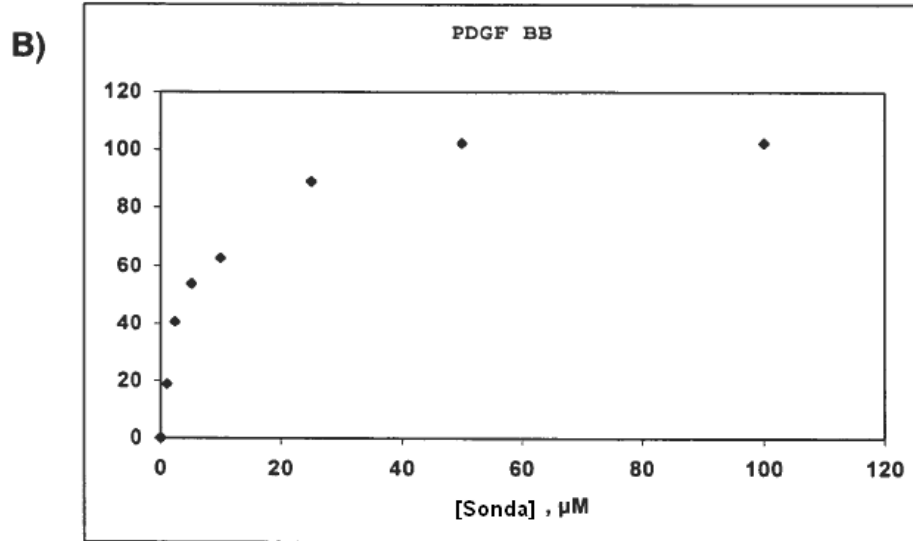
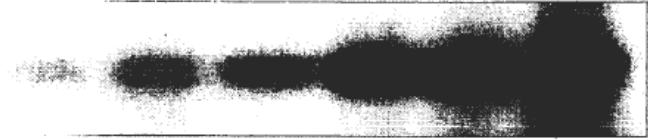
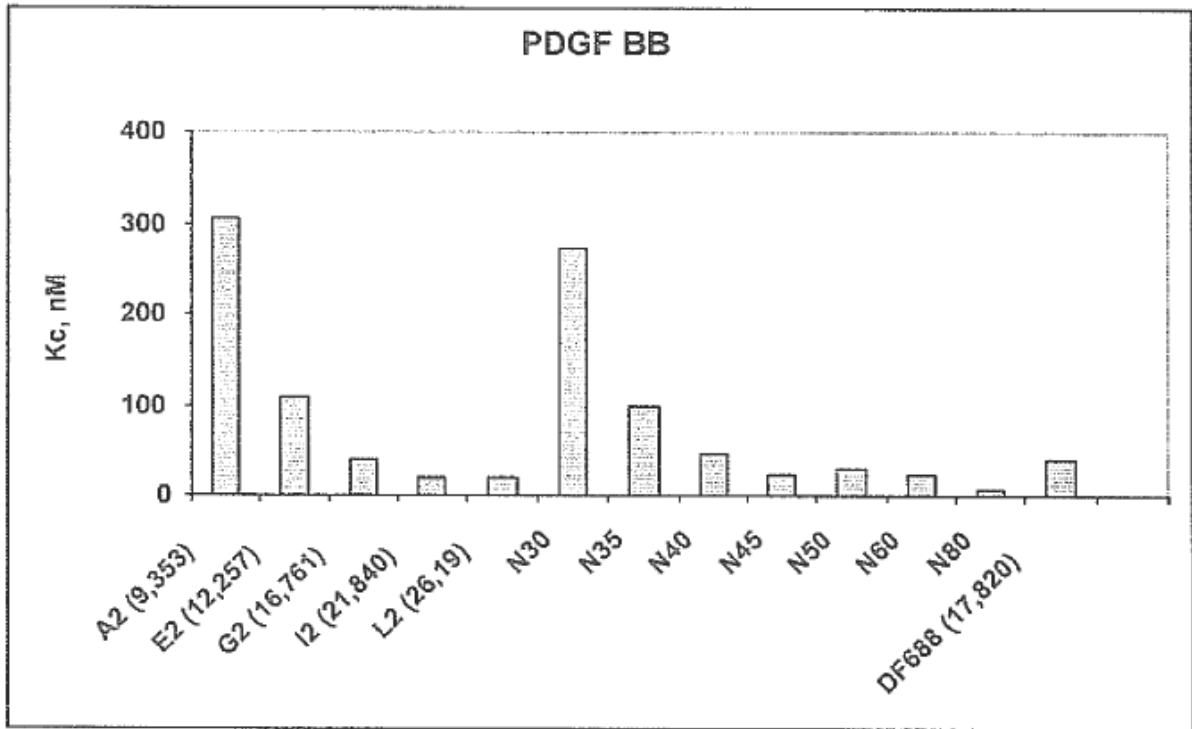
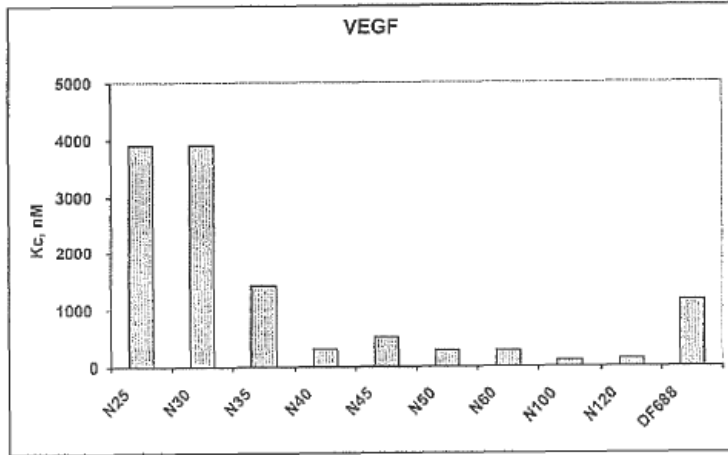


Fig. 3

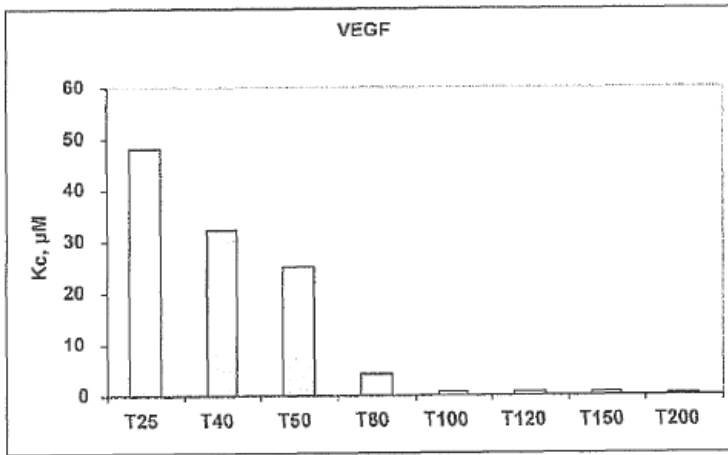


DF	Kc, nM
A2 (9,353)	304.3
E2 (12,257)	108.7
G2 (16,761)	38.5
I2 (21,840)	20.2
L2 (26,192)	20.5
N30	272
N35	99
N40	47
N45	22
N50	29
N60	23
N80	6
DF688 (17,820)	39.8

Fig. 4

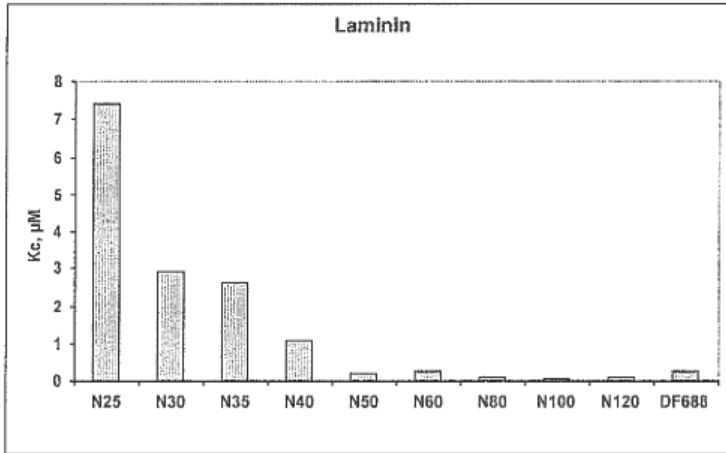


Oligo	Kc, nM
N25	3880
N30	3900
N35	1440
N40	327
N45	533
N50	298
N60	290
N100	110
N120	130
DF688	1170

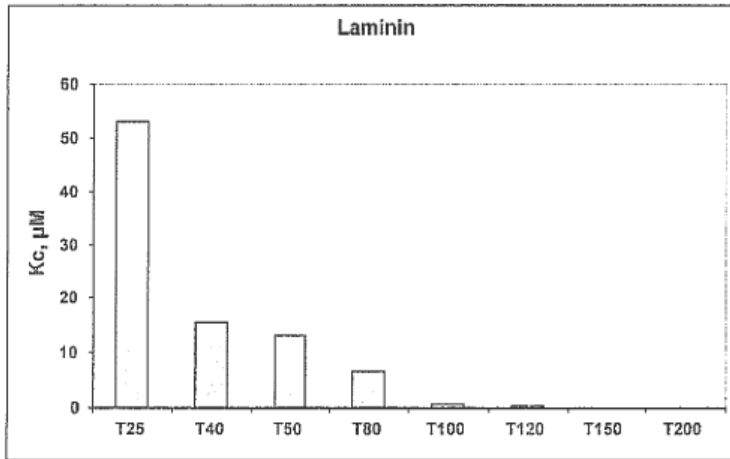


Oligo	Kc, nM
T25	48.1
T40	32.2
T50	25.2
T80	4.3
T100	0.5
T120	0.58
T150	0.49
T200	0.34

Fig. 5

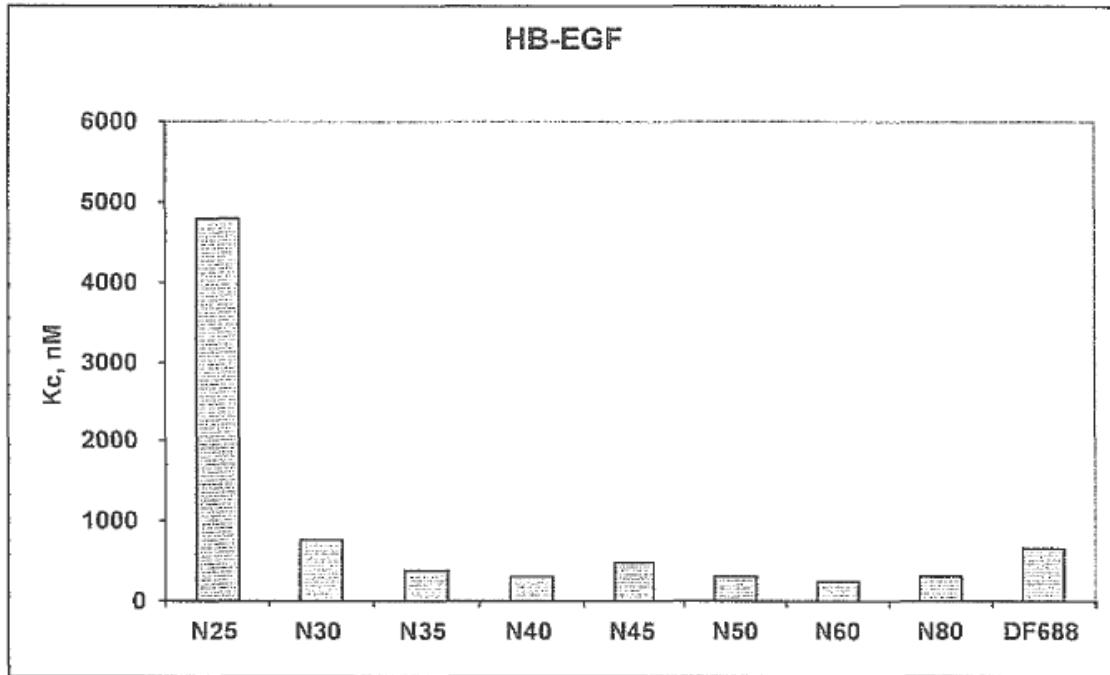


Oligo	Kc, μM
N25	7.4
N30	2.92
N35	2.6
N40	1.11
N50	0.185
N60	0.237
N80	0.097
N100	0.059
N120	0.092
DF688	0.27



Oligo	Kc, μM
T25	53
T40	15.6
T50	13.3
T80	6.7
T100	0.6
T120	0.38
T150	0.11
T200	0.1

Fig. 6



Oligo	K _c , nM
N25	4800
N30	757
N35	396
N40	318
N45	490
N50	313
N60	252
N80	321
DF688	648

Fig. 7

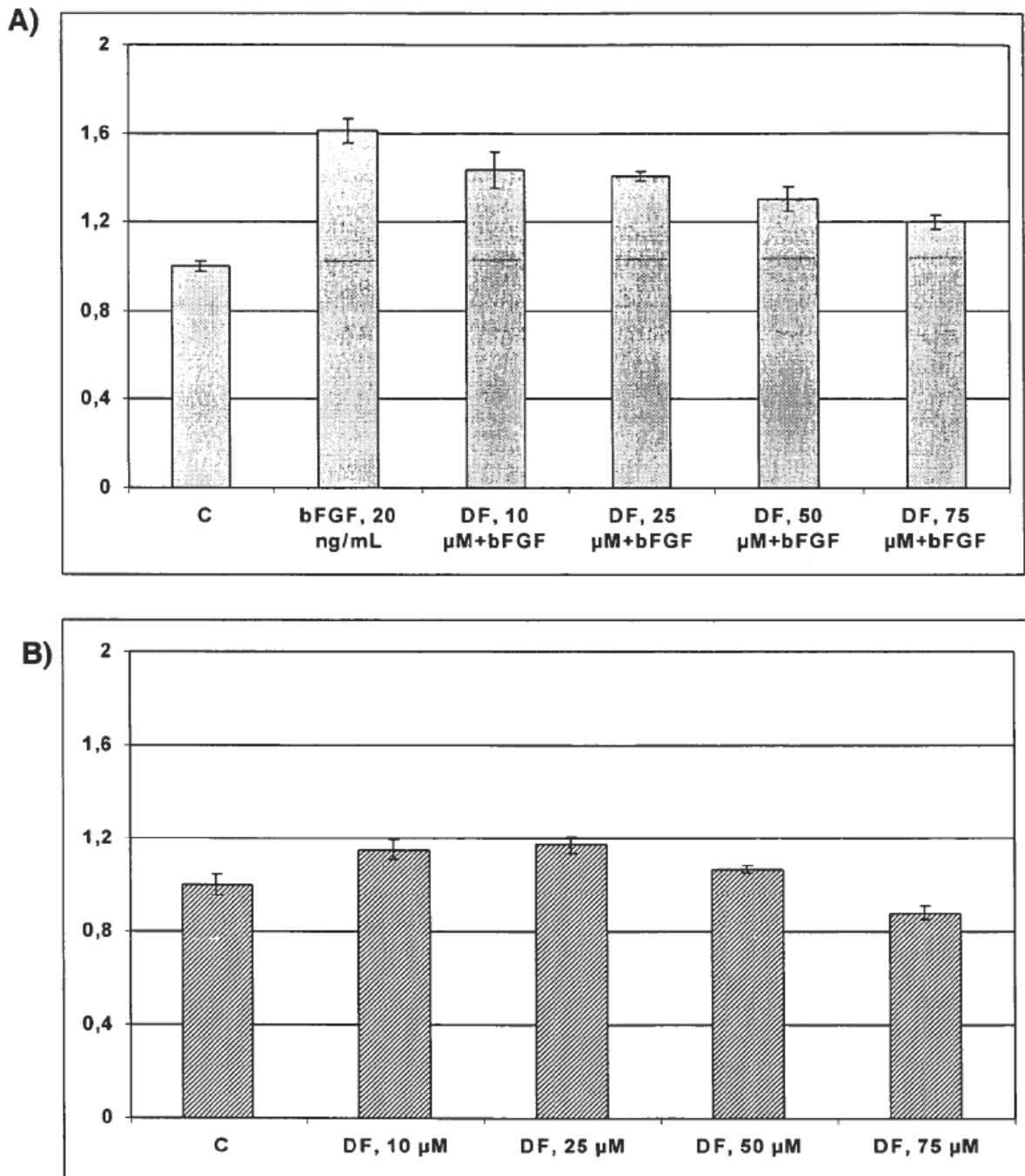


Fig. 8

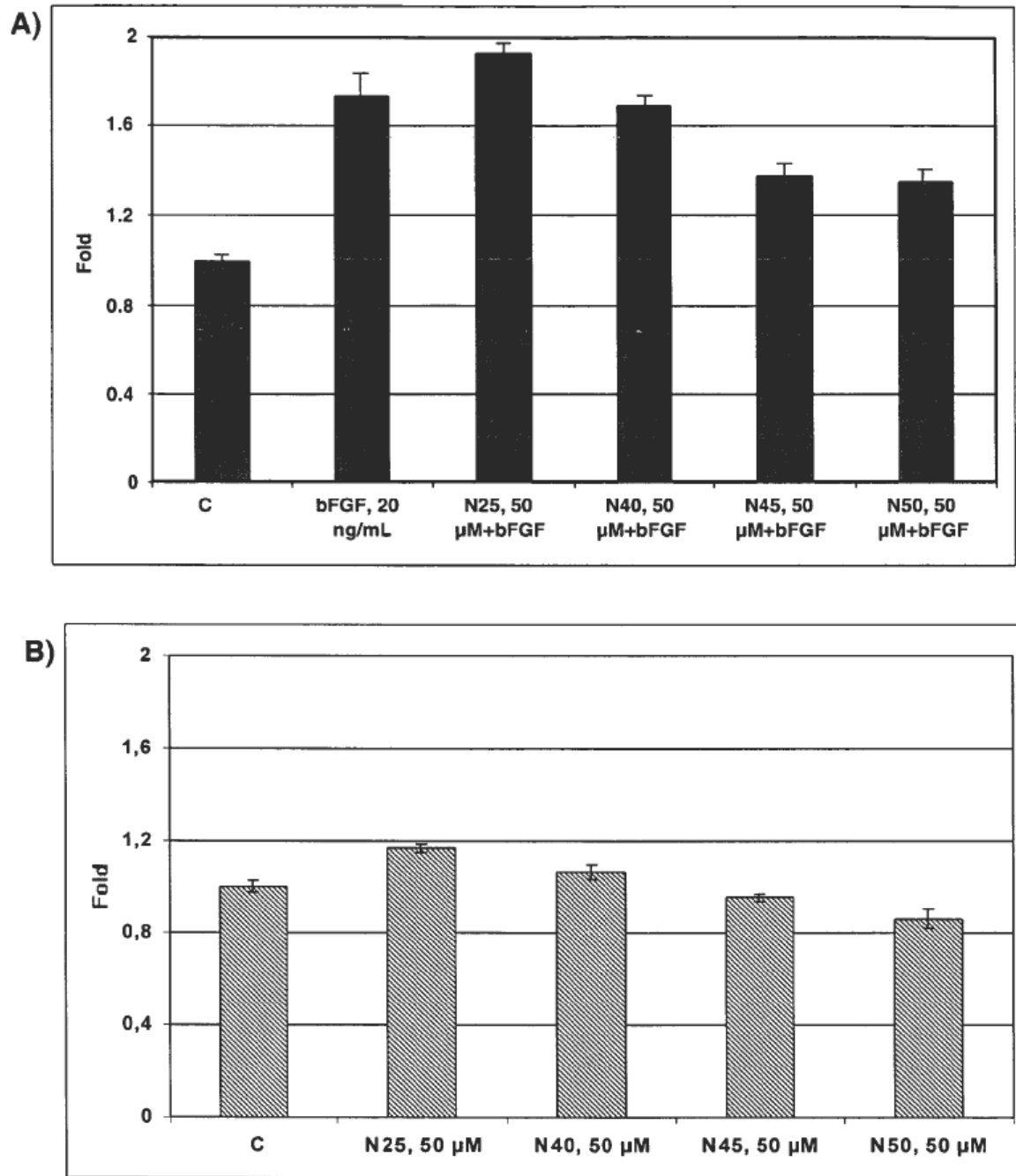


Fig. 9

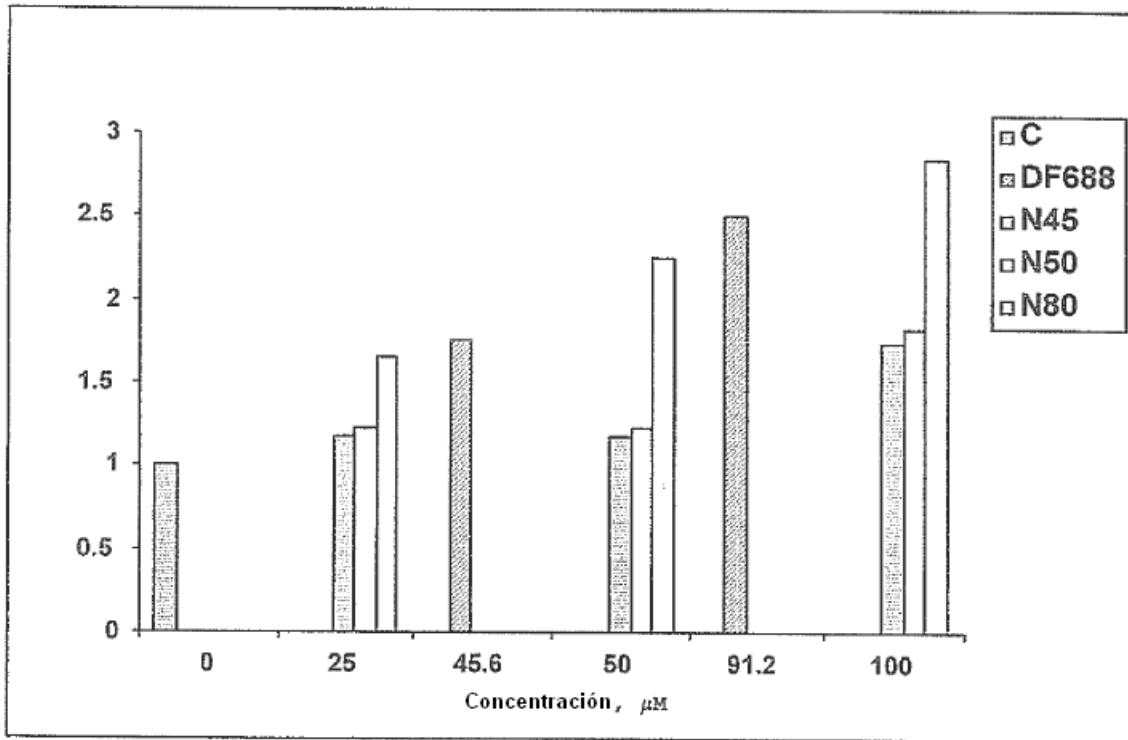


Fig. 10

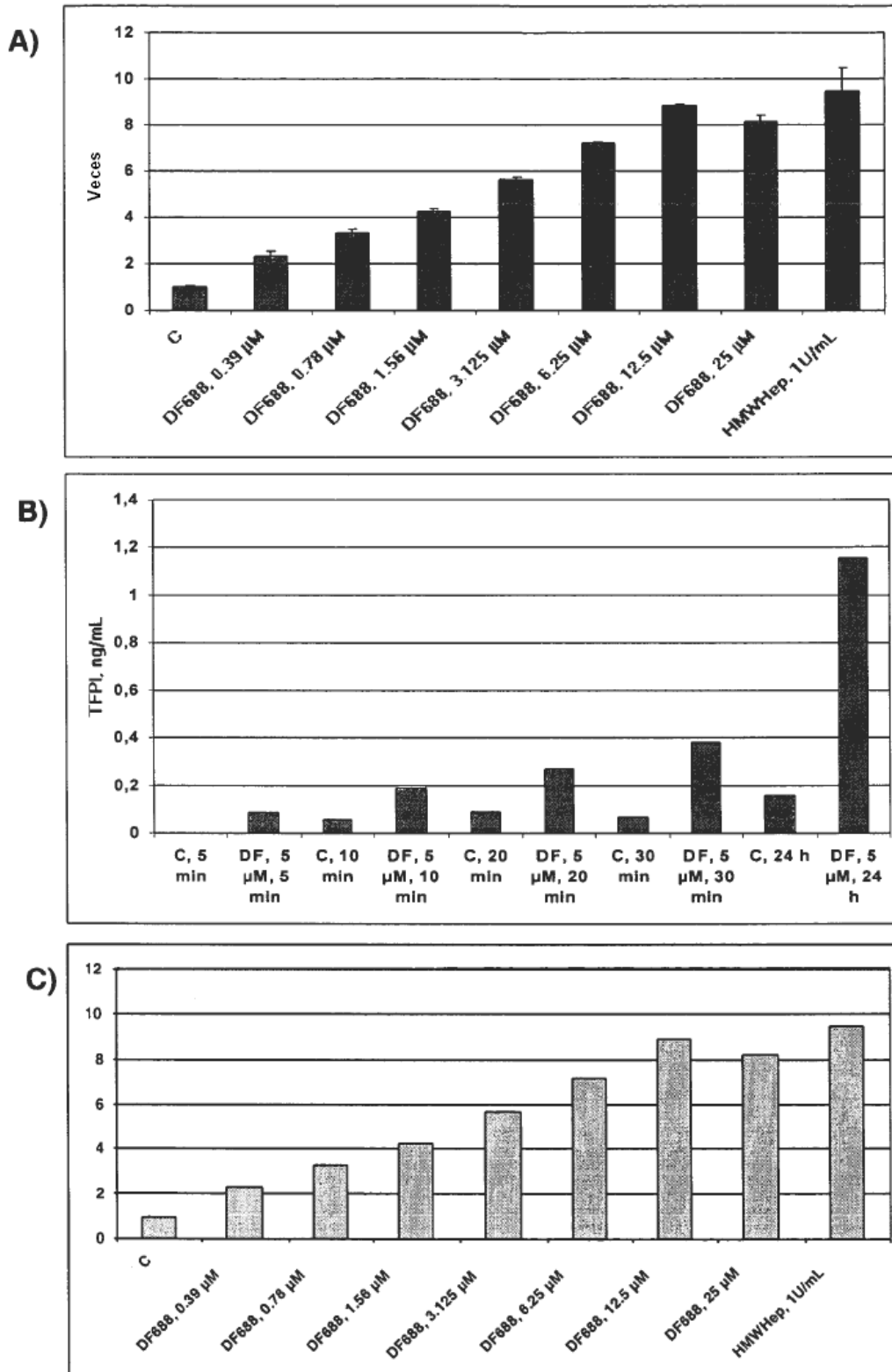


Fig. 11

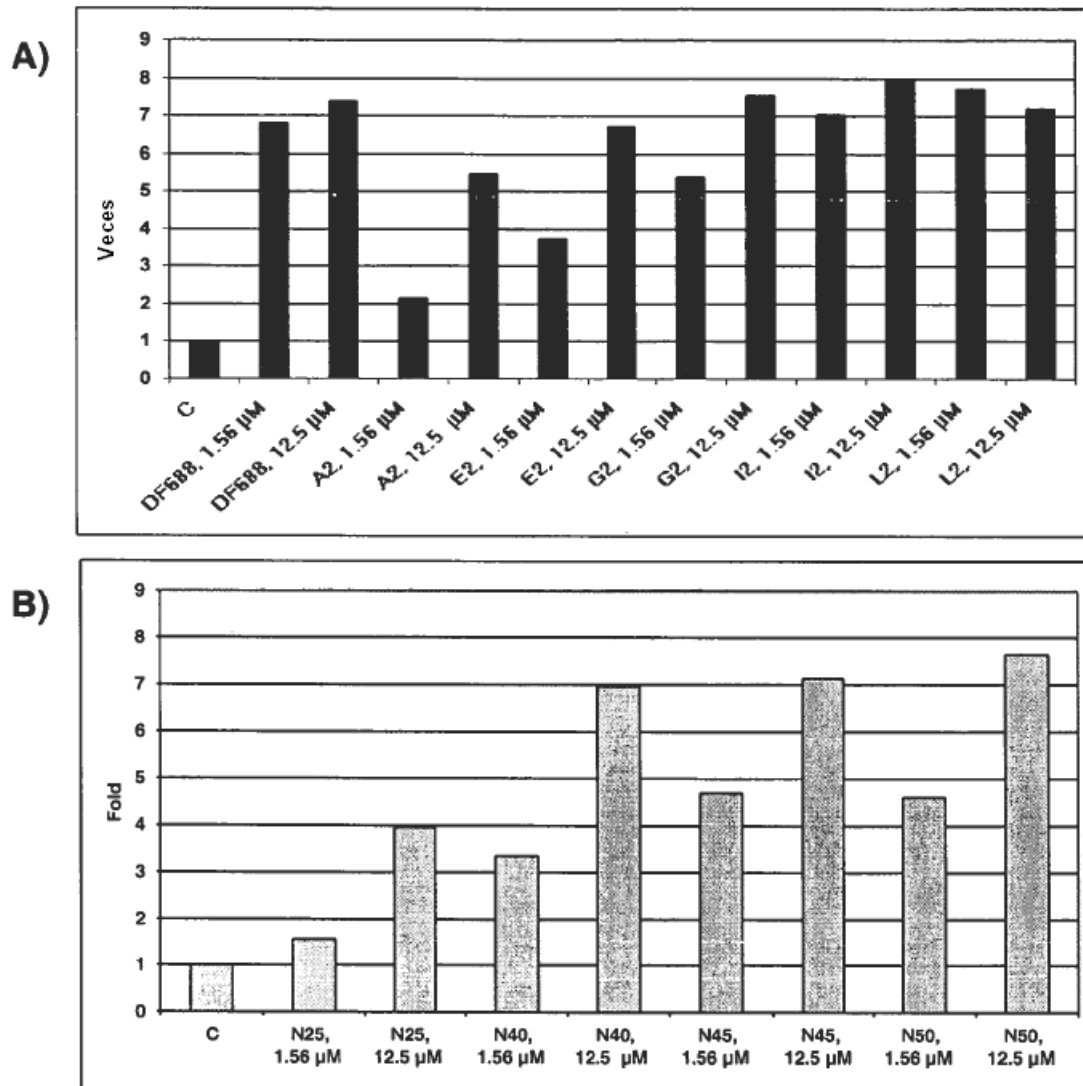


Fig. 12

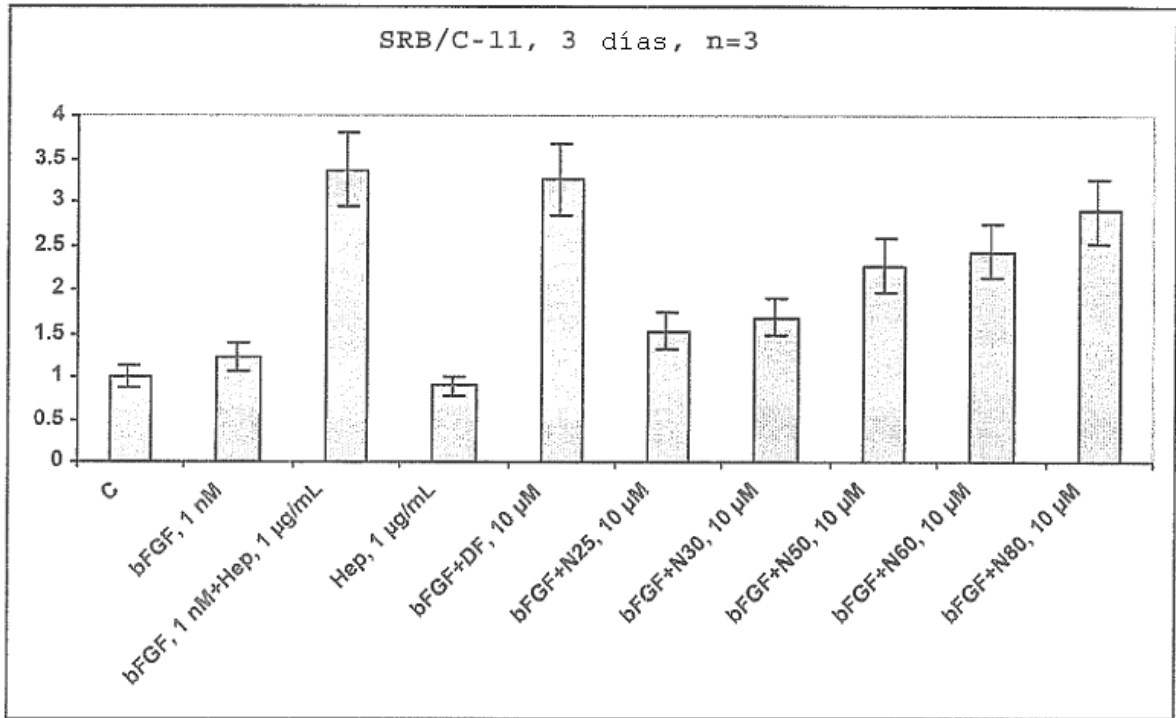


Fig. 13